



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/53853 (43) Date de publication internationale: 3 décembre 1998 (03.12.98)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01084</p> <p>(22) Date de dépôt international: 29 mai 1998 (29.05.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/06600 29 mai 1997 (29.05.97) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANS-GENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). ASSOCIATION FRANCAISE CONTRE LES MYOPATHIES [FR/FR]; 13 Place de Rungis, F-75013 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): BRAUN, Serge [FR/FR]; 28, Faubourg des Vosges, F-67120 Dorlisheim (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: COMBINED PRODUCT ASSOCIATING A NUCLEIC ACID WITH A SUBSTANCE BREAKING UP THE EXTRACELLULAR MATRIX FOR GENE THERAPY</p> <p>(54) Titre: PRODUIT DE COMBINAISON ASSOCIANT UN ACIDE NUCLEIQUE A UNE SUBSTANCE DESORGANISANT LA MATRICE EXTRACELLULAIRE POUR LA THERAPIE GENIQUE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a combined product comprising at least a substance breaking up a cell extracellular matrix and at least a nucleic acid of interest, to be administered simultaneously, consecutively or spread over time, said nucleic acid being carried by an infectious viral particle or in the form of a synthetic vector. The invention also concerns the use of said product for therapeutic or vaccine purposes to prepare a medicine for treating the human or animal body using gene therapy and the use of a substance breaking up the extracellular matrix to improve the transfer and/or the expression of said nucleic acid of interest in a host cell or organism.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention a pour objet un produit de combinaison comprenant au moins une substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire d'une cellule et au moins un acide nucléique d'intérêt, pour une administration simultanée, consécutive ou étalée dans le temps, ledit acide nucléique étant véhiculé par une particule virale infectieuse ou sous la forme d'un vecteur synthétique. Elle concerne également son utilisation à des fins thérapeutiques ou vaccinales pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique ainsi que l'utilisation d'une substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire pour améliorer le transfert et/ou l'expression de l'acide nucléique d'intérêt susmentionné dans une cellule ou un organisme hôte.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KR	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PRODUIT DE COMBINAISON ASSOCIANT UN ACIDE NUCLEIQUE A UNE
SUBSTANCE DESORGANISANT LA MATRICE EXTRACELLULAIRE POUR
LA THERAPIE GENIQUE.

5 La présente invention concerne un produit associant un acide
nucléique et une substance entraînant une désorganisation de la matrice
extracellulaire d'une cellule, notamment la hyaluronidase, pour une
utilisation simultanée, consécutive ou étalée dans le temps, ledit acide
nucléique étant véhiculé par une particule virale infectieuse ou sous la
10 forme d'un vecteur synthétique. Elle a également pour objet l'utilisation
d'un tel produit dans le but de favoriser le transfert de l'acide nucléique en
question dans une cellule ou un organisme hôte. Elle est particulièrement
utile dans le domaine du transfert de gène ou de la thérapie génique.

 La matrice extracellulaire est constituée de molécules protéiques et
15 polysaccharidiques assemblées en un réseau dense organisé dans l'espace
extracellulaire de la plupart des tissus. Elle joue un rôle physiologique
important de maintien de l'architecture tissulaire, de réservoir de facteurs
trophiques, de chemoattracteurs et de facteurs d'attachement de cellules.
Le hyaluronan (ou acide hyaluronique) est un constituant ubiquitaire de
20 la matrice extracellulaire des vertébrés. Ce polysaccharide linéaire à base
d'acide glucuronique et de glucosamine [D-glucuronic acid 1- β -3)N-acetyl-
D-glucosamine(1-b-4)] peut influencer les caractéristiques
physicochimiques des matrices de par sa propriété de former des solutions
très visqueuses. L'acide hyaluronique interagit également avec divers
25 récepteurs et protéines de liaison situés à la surface des cellules. Il est
impliqué dans de nombreux processus biologiques tels que la fertilisation,
le développement embryonnaire, la migration cellulaire et la
différenciation, la cicatrisation, l'inflammation, la croissance tumorale et
la formation de métastases.

30 L'acide hyaluronique est hydrolysé par la hyaluronidase. Son

hydrolyse entraîne une désorganisation de la matrice extracellulaire. La hyaluronidase est présente dans de nombreux liquides biologiques de l'organisme. Produite par l'acrosome des spermatozoïdes, elle assure leur pénétration dans l'ovule lors de la fécondation. Durant l'embryogénèse, elle favorise la migration des cellules embryonnaires vers les territoires qu'elles doivent coloniser.

Outre son action dans la plasticité et la différenciation tissulaire, le couple acide hyaluronique/hyaluronidase serait également impliqué dans certains processus pathologiques. Ainsi, cette enzyme est mise à profit par les cellules cancéreuses pour l'extension des tumeurs et l'angiogénèse qui assure le support nutritif de ces tumeurs. Co-sécrétée dans de nombreux venins (serpents, lézards, poissons, scorpions, abeilles, araignées...), elle augmenterait leur diffusion dans l'organisme de la proie. Elle intervient également dans l'action fusogène de virus comme le MLV (Moloney leukemia virus) ou le CAEV (Caprine arthritis encephalitis virus). Elle pourrait également agir en tant qu'agent de diffusion de virus lors d'une contamination bactérienne comme dans le cas des infections à Herpes (Romano et Moisseiev, Metab. Pediatr. Syst. Ophthalmol. 1982, 6: 361-365).

Par ailleurs, la hyaluronidase est utilisée depuis de nombreuses années en clinique humaine pour diverses applications : par exemple comme antioedémateux (Lasonil, Thiomucase), agent de diffusion de médicaments injectés par voie intramusculaire ou sous-cutanée (Hyaluronidase Choay), anti-cancéreux, dans la formulation d'anesthésiques locaux (Lewis-Smith, Br. J. Plast. Surg. 1986, 39: 554-558) ou encore en tant qu'agent réducteur de l'atteinte myocardique à la suite d'infarctus. La possibilité d'utiliser la hyaluronidase dans le domaine de la transfection d'ADN a déjà été évoquée par Dubensky et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81: 7529-7533). Ce document démontre une transfection plus uniforme *in vivo* par co-injection d'ADN plasmidique et d'un mélange de collagénase et de hyaluronidase. Cependant, l'effet

bénéfique n'est pas obtenu avec un ADN plasmidique n'ayant pas été au préalable précipité au phosphate de calcium. De même, WO 95/26718 concerne une méthode pour transférer de l'ADN exclusivement nu dans des cellules qui consiste à utiliser un agent qui facilite la pénétration dudit
5 ADN nu à l'intérieur des cellules. Ainsi l'exploitation de cette technologie en thérapie génique utilisant des vecteurs non précipités ou des particules virales est difficilement envisageable.

La présente invention vise à étendre le potentiel thérapeutique de la hyaluronidase au domaine du transfert de gènes, notamment en thérapie
10 génique. Il est important de pouvoir disposer d'outils favorisant la distribution des vecteurs de gènes ou l'expression de ces derniers au sein de l'organisme hôte pour améliorer l'efficacité de cette nouvelle technologie. La présente invention apporte une solution avantageuse à ce problème. On a maintenant mis en évidence les capacités de la hyaluronidase à favoriser
15 le transfert ou l'expression d'un acide nucléique dans une cellule ou un organisme hôte. Comme le montrent les exemples qui suivent, l'administration intramusculaire d'une solution de hyaluronidase quelques heures avant l'injection dans le même muscle d'adénovirus recombinant augmente sensiblement l'expression du gène recombinant. Cette utilisation
20 combinée améliore l'effet thérapeutique et permet l'emploi de doses réduites de vecteurs.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un produit de combinaison comprenant au moins une substance entraînant une désorganisation d'une matrice extracellulaire d'un hôte et au moins un
25 acide nucléique d'intérêt, pour une administration simultanée, consécutive ou étalée dans le temps, ledit acide nucléique étant véhiculé par une particule virale infectieuse au sous la forme d'un vecteur synthétique.

Le terme "matrice extracellulaire" bien connu dans le domaine de l'art est développé dans la partie introductive. Au sens de la présente
30 invention, "substance entraînant une désorganisation de la matrice

extracellulaire" désigne toute substance agissant sur l'intégrité de la matrice, notamment exerçant une action dégradative ou déstabilisante totale ou partielle sur l'un au moins des constituants de ladite matrice ou sur les liens qui unissent ces divers constituants. Dans le cadre de la présente invention, on peut avoir recours à une substance connue mais également, s'il s'agit d'une substance de nature protéique, à un mutant comportant une ou plusieurs mutations par addition, délétion et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la protéine native, un fragment fonctionnel ou encore une protéine chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses. Aux fins de la présente invention, ladite substance peut également être modifiée par voie chimique, enzymatique ... etc, dans le but d'augmenter son activité, sa stabilité ou encore son tropisme à l'égard d'un type cellulaire particulier. Le choix d'une substance en usage dans la présente invention est large. A titre indicatif, elle peut être choisie parmi les substances ayant une activité collagénase, dispase, trypsine, pronase.

Selon un mode de réalisation avantageux, on préfère avoir recours à une substance capable d'hydrolyser les polysaccharides habituellement présents dans les matrices extracellulaires, et tout particulièrement l'acide hyaluronique. A cet égard, une substance ayant une activité hyaluronidase convient tout particulièrement à la mise en oeuvre de l'invention. Les hyaluronidases sont décrites dans Kreil (Protein Sci., 1995, 4: 1666-1669). Il peut s'agir d'une hyaluronidase dérivant d'une hyaluronate glycanohydrolase de mammifère, de reptile et d'hyménoptère, d'une hyaluronate glycanohydrolase de glande salivaire de sangsue ou d'une hyaluronate lyase bactérienne notamment de streptocoque, pneumocoque et clostridium. Parmi celles-ci, on préfère tout particulièrement la hyaluronidase de testicules bovins. On aura de préférence recours à une substance présentant un degré d'homologie avec la séquence d'une hyaluronidase ou un fragment fonctionnel de celle-ci d'au moins 70 %, de

manière avantageuse d'au moins 90 % et, de manière préférée d'au moins 95 %, l'important étant que l'activité hyaluronidase soit conservée. Cette activité enzymatique peut être évaluée par les techniques conventionnelles telles que celles décrites dans Hynes et Ferretti (Methods Enzymol., 1994, 235: 606-616) ou Bailey et Levine (J. Pharm. Biomed. Anal., 1993, 11: 285-292).

La substance composant le produit de combinaison selon l'invention peut être une substance disponible commercialement, de préférence acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Selon une autre approche, il est possible de la produire par voie recombinante par les techniques classiques dans ce domaine de l'art. Enfin, on peut aussi envisager d'introduire la séquence codante pour ladite substance dans l'acide nucléique d'intérêt ou un vecteur d'expression sous le contrôle des éléments appropriés à son expression dans une cellule ou un organisme hôte. Ce dernier peut alors être administré préalablement ou simultanément à l'acide nucléique d'intérêt. La mise en oeuvre de ce mode de réalisation spécifique est à la portée de l'homme de l'art.

Dans le cadre de la présente invention, l'acide nucléique d'intérêt peut être un oligonucléotide, un acide ribonucléique ou un acide désoxyribonucléique, sens ou antisens. Ces dénominations sont classiquement utilisées en biologie moléculaire. En bref, "sens" désigne un acide nucléique ayant une séquence homologue ou identique à une séquence cible alors que antisens fait référence à un acide nucléique ayant une séquence homologue ou identique à une séquence complémentaire à une séquence cible. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, l'acide nucléique d'intérêt comporte au moins un gène d'intérêt et des éléments permettant son expression dans une cellule ou un organisme hôte. Il est avantageusement sous forme d'ADN plasmidique ou de vecteur viral (dérivé d'un adénovirus, rétrovirus, poxvirus et en particulier d'un virus de la vaccine ou d'un MVA, virus de l'herpès, virus

associé à l'adénovirus....). L'acide nucléique d'intérêt est véhiculé par une particule virale infectieuse ou sous la forme d'un vecteur synthétique (lipide cationique, liposome, polymère cationique....) ou une cellule ingénierée (cellule transfectée ou transduite par ledit acide nucléique) ou
5 non ingénierée (comportant naturellement ledit acide nucléique).

S'agissant de la variante selon laquelle l'acide nucléique est sous forme d'ADN plasmidique, on indique que l'ADN est de préférence en solution dans de l'eau ou tout tampon aqueux et n'a pas subi de précipitation au phosphate de calcium préalablement à sa mise en
10 solution. Le choix des plasmides utilisables dans le cadre de la présente invention est vaste. Ils peuvent être d'une origine quelconque (procaryote, eucaryote) ou être formés par l'assemblage d'éléments variés. D'une manière générale, les plasmides sont connus de l'homme de l'art. Un grand nombre d'entre eux sont disponibles commercialement mais, il est
15 également possible de les construire par les techniques de manipulation génétique (Maniatis et al., 1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Il peut s'agir d'un vecteur de clonage ou d'expression dérivé par exemple de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagène), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) ou
20 encore p Poly (Lathe et al., Gene, 1987, 57: 193-201). A titre indicatif, l'ADN plasmidique en usage dans la présente invention peut être amplifié et purifié selon les pratiques générales de l'art. Etant donné qu'il s'agit d'une technologie largement connue à ce jour, il ne sera procédé qu'à une description brève de la manière d'opérer qui consiste à introduire le
25 plasmide dans les cellules productrices (par exemple *Escherichia coli*), les cultiver dans des conditions adéquates (facilement établies par l'homme du métier sur la base des connaissances générales dans ce domaine et du système de sélection porté par le plasmide) et récupérer l'ADN plasmidique selon les techniques habituelles (voir par exemple Maniatis et al., 1989,
30 *supra*). Une étape de purification peut également être envisagée, par

exemple par mise en oeuvre du procédé décrit dans la demande française FR96 11075 ou tout autre méthode publiée dans la littérature.

Selon une variante par ailleurs préférée, l'acide nucléique d'intérêt est porté par un vecteur adénoviral défectif pour la réplication (incapable de replication autonome dans une cellule hôte). La technologie des adénovirus est décrite dans l'état de la technique (voir par exemple Graham et Prevec in *Methods in Molecular Biology*, 1991, vol 7, p 109-128, ed E.J. Murey, The Human Press Inc). Avantageusement, le vecteur adénoviral utilisé dans le cadre de la présente invention, dérive du génome d'un adénovirus, comprend au moins les ITRs (Inverted Terminal Repeat) et une séquence d'encapsidation et est dépourvu de tout ou partie de la région adénovirale E1. Il peut en outre être dépourvu de tout ou partie de la région adénovirale E3. Cependant, selon un mode avantageux, on préfère conserver la partie de la région E3 codant pour des polypeptides permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte, notamment la glycoprotéine gp19k (Gooding et al., *Critical Review of Immunology*, 1990, 10 : 53-71). En outre, il peut comprendre des délétions ou mutations supplémentaires, touchant notamment tout ou partie d'une ou plusieurs régions sélectionnées parmi les régions E2, E4, L1, L2, L3, L4 et L5 (voir par exemple la demande internationale WO 94/28152). Pour illustrer ce point, on peut citer la mutation thermosensible affectant le gène DBP (pour DNA Binding Protein en anglais) de la région E2A (Ensinger et al., *J. Virol.*, 1972, 10 : 328-339). Une autre variante ou une combinaison intéressante consiste à déléter la région E4 à l'exception des séquences codant pour les cadres de lecture ouverts (ORF) 6 et 7 (ces délétions limitées ne nécessitent pas de complémentation de la fonction E4 ; Ketner et al., *Nucleic Acids Res.*, 1989, 17: 3037-3048). Préférentiellement, le ou les gènes d'intérêt sont insérés dans le vecteur en remplacement des régions adénovirales délétées, notamment de E1. Dans le cas où l'on met en oeuvre plusieurs gènes d'intérêt, ils peuvent être

insérés au même endroit ou à des endroits différents du génome viral, être sous le contrôle des mêmes éléments de régulation ou d'éléments indépendants et, le cas échéant, ils peuvent être en orientation réverse les uns par rapport aux autres afin de minimiser les phénomènes d'interférence au niveau de leur expression. Le génome du vecteur adénoviral recombinant peut être préparé par les techniques de biologie moléculaire ou par recombinaison homologue (voir WO 96/17070).

La propagation des vecteurs adénoviraux utilisés dans le cadre de la présente invention, est effectuée dans une lignée de complémentation capable de fournir *en trans* la ou les fonctions défectueuses afin de produire les polypeptides nécessaires à la constitution des particules virales infectieuses. Par exemple, on aura recours à la lignée 293 pour compléter la fonction E1 (Graham et al., J. Gen. Virol., 1977, 36: 59-72) ou les lignées décrites dans la demande internationale WO 97/04119 pour une double complémentation. On peut également employer une lignée cellulaire appropriée et un virus auxiliaire pour compléter l'ensemble des fonctions défectives. Les particules virales produites sont récupérées de la culture cellulaire et, éventuellement purifiées par les techniques de l'art (gradient de chlorure de césium, étapes chromatographiques).

Le vecteur adénoviral utilisé dans le cadre de la présente invention, peut dériver du génome d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral de différentes origines. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., Arch. Virol., 1993, 128: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, J. Gen. Virol., 1989, 70: 165-172 ; Jouvenne et al., Gene, 1987, 60: 21-28 ; Mittal et al., J. Gen. Virol., 1995, 76: 93-102). Cependant, on préférera un vecteur adénoviral d'origine humaine dérivant de préférence

d'un adénovirus de sérotype C, notamment de type 2 ou 5.

En ce qui concerne l'acide nucléique d'intérêt, il peut coder pour un ARN antisens et/ou un ARNm qui sera ensuite traduit en un polypeptide d'intérêt thérapeutique. Il peut être de type génomique, ADN
5 complémentaire (ADNc) ou mixte (minigène, dans lequel au moins un intron est délété), être homologue ou hétérologue à la cellule hôte. Le polypeptide pour lequel il code peut correspondre à tout ou partie d'une protéine telle que trouvée dans la nature (protéine native ou tronquée) ou un mutant présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou
10 modifiées. Il peut également s'agir d'un polypeptide chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses. L'acide nucléique d'intérêt peut être obtenu par synthèse chimique ou par clonage (criblage de banque d'ADN à l'aide de sondes appropriées, PCR...) et peut être modifié par les techniques conventionnelles de biologie moléculaire.

15 Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser un gène d'intérêt codant pour une cytokine ou une lymphokine (interféron α , β ou γ , interleukine (IL), notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou encore l'IL-12, un facteur nécrosant des tumeurs (TNF), un facteur stimulateur de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...), un récepteur
20 cellulaire ou nucléaire (notamment ceux reconnus par le virus HIV), un ligand de récepteur, une protéine impliquée dans une maladie génétique (facteur VII, facteur VIII, facteur IX, dystrophine, insuline, protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), hormone de croissance....), une enzyme (uréase, rénine, thrombine....), un inhibiteur
25 d'enzyme (α 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteurs de protéases virales...), un polypeptide à effet anti-tumoral capable d'inhiber au moins partiellement l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers (ARN anti-sens, anticorps, inhibiteur agissant au niveau de la division cellulaire ou des signaux de transduction, produit d'expression d'un gène
30 suppresseur de tumeur, par exemple p53 ou Rb, protéine stimulant le

5 système immunitaire, antigène associé à une tumeur, notamment MUC-1 et E6, E7, L1, L2 d'un virus à papillome HPV....), un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I ou II ou un polypeptide agissant sur l'expression des gènes correspondants, un polypeptide capable
10 d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement (polypeptide immunoprotecteur, épitope antigénique, anticorps, variant trans-dominant...), un produit cytotoxique (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique.....), une immunotoxine ou encore un polypeptide marqueur
15 (b-galactosidase, luciférase....). Il est à signaler que cette liste n'est pas limitative et que d'autres gènes peuvent également être employés.

Par ailleurs, l'acide nucléique d'intérêt en usage dans la présente invention peut également comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées. On peut citer les gènes
20 *néo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transférase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase). D'une manière générale, les gènes de sélection sont connus de l'homme de l'art.

25 Le ou les gènes portés par l'acide nucléique d'intérêt sont placés sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans la cellule ou l'organisme hôte. Il s'agit des éléments permettant leur transcription en ARN et la traduction d'un ARNm en polypeptide. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut être isolé d'un gène
quelconque d'origine eucaryote ou même virale et peut être constitutif ou
régulable. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène en question. Par ailleurs, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription, rendre un promoteur constitutif régulable ou vice versa, introduire un site de
30 restriction... On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs viraux

CMV (Cytomégalo virus), RSV (Rous Sarcoma Virus), du gène TK du virus HSV-1, précoce du virus SV40 (Simian Virus 40), adénoviral MLP (Major Late Promoter) ou encore les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycerate kinase) murin ou humain, α 1-antitrypsine (foie-spécifique), immunoglobuline (lymphocyte-spécifique), surfactant, CFTR (poumon spécifique) ou actine (muscle spécifique). Bien entendu, l'acide nucléique d'intérêt peut en outre comprendre des éléments additionnels améliorant l'expression (séquence intronique, séquence signal, séquence de localisation nucléaire, séquence terminatrice de la transcription, site d'initiation de la traduction de type IRES ou autre....) ou encore à sa maintenance dans la cellule hôte (origine de répllication ...). De tels éléments sont connus de l'homme de l'art.

Comme indiqué précédemment, l'acide nucléique d'intérêt et la substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire compris dans le produit de combinaison selon l'invention peuvent être utilisés simultanément, consécutivement ou de manière étalée dans le temps. Simultanément fait référence à une co-administration. Dans ce cas, ces deux composantes essentielles peuvent être mélangées préalablement à l'administration ou peuvent être administrées en même temps dans la cellule ou l'organisme hôte. Il est également possible de les administrer consécutivement c'est à dire l'une après l'autre, quelle que soit la composante du produit de combinaison selon l'invention administrée en premier. Enfin, on peut avoir recours à un mode d'administration étalé dans le temps ou intermittent qui s'arrête et reprend à intervalle régulier ou non. On indique que les voies et les sites d'administration des deux composantes peuvent être différents. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, la substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire est administrée avant l'acide nucléique, la voie d'administration des deux composantes étant de préférence semblable (par exemple intramusculaire dans les deux cas). L'intervalle de temps entre les

injections n'est pas critique et peut être défini par l'homme de l'art. On peut recommander un intervalle de 10 min à 72 h, avantageusement de 30 min à 48 h, de préférence de 1 à 24 h et, de manière tout à fait préférée, de 1 à 6 h.

5 Par ailleurs, le produit de combinaison selon l'invention peut également être associé à une ou plusieurs molécule(s) destinée à améliorer l'administration d'acide nucléique. Il peut s'agir de molécules ayant un effet protecteur sur l'acide nucléique (protection à l'égard de la dégradation
10 hôte (peptide fusogène, signal de localisation nucléaire...), permettant le ciblage d'un type cellulaire particulier (ligand ou anticorps reconnaissant une protéine de surface cellulaire...), ou prolongeant l'effet thérapeutique (agent immunosuppresseur....). Il peut être également associé à des agents facilitant la transfection (protéines ...).

15 Le produit de combinaison selon l'invention peut être préparé en vue d'une administration locale parentérale ou par voie digestive. On peut citer notamment la voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intraveineuse, intrapéritonéale, intrasynoviale, intratumorale, intrapulmonaire, intranasale ou intratrachéale et, tout particulièrement,
20 intramusculaire. L'administration peut avoir lieu par toute technique de l'art (injection, voie orale, aérosol, instillation...), en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration peut être adaptée selon le gène d'intérêt à transférer et la maladie à traiter. La formulation peut inclure des véhicules (excipients,
25 adjuvants...) pharmaceutiquement acceptables. De préférence, la substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire et l'acide nucléique d'intérêt sont en solution dans un tampon approprié à un usage pharmaceutique qui peut être hyper, hypo ou isotonique. Les tampons envisageables sont variés. On peut citer à titre illustratif, une
30 solution saline physiologique (NaCl 0,9 %), une solution saline non

physiologique (NaCl 1,8 %), une solution Hépes-Ringer, de Lactate-Ringer, un tampon à base de Tris-HCl (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 à 8, EDTA 1 mM ; Tris-HCl 10 mM pH 7,5 à 8, $MgCl_2$ 1 mM), un tampon phosphate (tampon phosphate H_2O Krebs), une solution de sucre (glucose, saccharose, 5 tréhalose....) ou simplement de l'eau.

Avantageusement, le produit de combinaison selon l'invention contient une quantité de substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire suffisante pour améliorer la diffusion de l'acide nucléique d'intérêt, en particulier au niveau ou à proximité du site 10 d'injection. La quantité nécessaire varie en fonction de différents paramètres, par exemple de la substance choisie, de la voie d'administration, du tissu cible, de l'individu à traiter, ou de l'étendue de la zone à traiter. S'agissant de la hyaluronidase, la quantité adéquate peut correspondre à celles habituellement utilisées dans les applications d'agent 15 de diffusions de molécules pharmacologiques. A titre indicatif, la dose à mettre en oeuvre est comprise entre 1 et 10^4 unités internationales (IU), avantageusement entre 1 et 10^3 et de préférence entre 10 et 500 IU.

Par ailleurs la quantité d'acide nucléique d'intérêt peut être définie en fonction du gène thérapeutique et du vecteur utilisé. S'agissant de la 20 variante selon laquelle on met en oeuvre des particules adénovirales, celles-ci sont de préférence formulées sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} ufp (unités formant des plages), avantageusement 10^5 et 10^{13} ufp et, de préférence, 10^6 et 10^{12} ufp. Dans le cas où l'acide nucléique d'intérêt est sous forme d'un ADN plasmidique, les quantités peuvent 25 varier de 0,05 à 100 mg et avantageusement de 0,1 à 10 mg.

La présente invention concerne également l'utilisation à des fins thérapeutiques ou vaccinales d'un produit de combinaison selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique ainsi que l'utilisation d'une 30 substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire

pour améliorer la diffusion, le transfert et/ou l'expression d'un acide nucléique d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte. L'organisme hôte est avantageusement un mammifère, de préférence l'homme. Quant à la cellule hôte, il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une
5 origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, monocyte, lymphocyte, macrophage....), musculaire (cellule satellite, myocyte, myoblaste....), hépatique, épithéliale, fibroblaste, pulmonaire ou trachéale. Selon une première possibilité, le médicament ou la substance peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse,
10 intramusculaire, dans une tumeur accessible, dans les voies respiratoires par aérosol...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique...), à les traiter *in vitro* avant de les réadministrer au patient. La substance entraînant une désorganisation de
15 la matrice extracellulaire est de préférence une hyaluronidase et, selon un mode préféré déjà cité, elle est administrée préalablement à l'acide nucléique d'intérêt.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement et/ou la prévention selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement
20 efficace d'un produit de combinaison selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement. Les maladies ciblées sont notamment les maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, diabète, myopathie de Duchenne ou de Becker...), les cancers et tumeurs (éventuellement induits par des oncogènes ou des virus), les infections virales (hépatites B et C,
25 SIDA, herpès....). Un produit de combinaison administrable par voie intramusculaire ou intraveineuse et associant la hyaluronidase et un acide nucléique exprimant le gène de la dystrophine convient tout particulièrement au traitement par thérapie génique de la dystrophie musculaire de Duchenne. En effet, les muscles atteints sont le siège d'une
30 invasion de tissu conjonctif (et donc, de matrice extracellulaire). Un

traitement par la hyaluronidase pourrait permettre d'accroître les possibilités de diffusion de l'acide nucléique d'intérêt et sa pénétration dans les fibres musculaires protégées par une matrice extracellulaire compacte et dense. Une autre application préférée est le traitement de la mucoviscidose, pour lequel la hyaluronidase pourrait permettre à la fois la réduction du mucus et la diffusion de l'acide nucléique thérapeutique. Dans ce cas, on peut envisager l'administration dans les voies respiratoires (aérosol, instillation....) ou intraveineuse d'un acide nucléique exprimant la protéine CFTR.

10 La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples qui suivent:

Exemple 1 : Effet de la hyaluronidase sur l'administration intramusculaire d'un adénovirus codant pour le gène de la luciférase

15

L'acide nucléique d'intérêt comportant le gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle du promoteur MLP d'Ad2 et des séquences de polyadénylation du virus SV40, est porté par un vecteur adénoviral délété des régions E1 et E3. La construction finale désignée pTG8509 est réalisée selon les techniques générales de génie génétique et clonage moléculaire détaillées dans Maniatis et al. (1989, *supra*). La première étape consiste à cloner la cassette d'expression du gène luciférase dans un plasmide bactérien. On peut par exemple introduire le gène luciférase dans le plasmide pTG6580 (décrit dans la demande internationale WO 94/28152), qui comprend dans une structure p poly II (Lathe et al., 1987, *supra*) l'ITR 5' et la région d'encapsidation de l'Ad5 (nt 1 à 458 tels que divulgués dans la banque de données Genebank sous la référence M73260), le promoteur MLP de l'Ad2, un polylinker, le signal de terminaison de la transcription polyA de SV40 (nt 2543 à 2618 tels que divulgués dans la banque de données Genebank sous la référence J02400) suivis des séquences Ad5

20
25
30

des nt 4047 à 6241. Puis, la cassette luciférase est insérée dans le squelette adénoviral à la place de la région E1 par recombinaison homologue avec le vecteur pTG3602 (voir demande internationale WO 96/17070) linéarisé par *Clal* et dans la souche *E. coli* BJ5183 (Hanahan, 5 J. Mol. Biol., 1983, 166: 557-580).

Les particules adénovirales correspondantes sont produites après transfection de la lignée 293 (ATCC CRL1573) par le fragment *PacI* isolé du vecteur pTG8509 et portant le génome adénoviral et récupérées de la culture après lyse cellulaire (habituellement 3 cycles consécutifs de 10 congélation-décongélation). Les particules adénovirales AdTG8509 sont amplifiées et purifiées sur gradient de chlorure de césium avant leur administration *in vivo*.

Le produit de combinaison testé associe 10^9 unités infectieuses d'AdTG8509 et des doses variables de hyaluronidase de testicules bovins 15 obtenues par dilution d'une préparation lyophilisée (type VI-S, Sigma à 3100 UI) dans NaCl 0,9 %.

Dix souris femelles balb/c âgées de 7 semaines sont réparties au hasard en 5 groupes d'expérimentation recevant dans les deux muscles *tibialis anterior* 25 ml d'une solution de hyaluronidase dont les doses 20 s'échelonnent de 0 UI, 0,05 UI, 0,1 UI, 1 UI et 10 UI et 3 heures après, 25 ml d'une suspension virale d'AdTG8509 titrant 10^9 unités infectieuses. Le transfert du gène luciférase est évalué après résection de chaque muscle traité, une semaine après les injections de la hyaluronidase et du vecteur. Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale et les muscles sont 25 immédiatement prélevés et congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C . L'activité luciférase est mesurée au luminomètre (Microumat LB 96P, Berthold) après broyage du muscle entier et extraction de l'enzyme (Kit Promega). Cette activité enzymatique se traduit en émission de photons exprimée en unités de lumière par minute (RLU). L'administration de 30 hyaluronidase à des doses supérieures à 1 UI s'accompagne d'une

augmentation significative de l'expression du gène luciférase par rapport au groupe témoin (0 UI). Le facteur d'amplification est d'environ 2 chez les animaux traités par 1 UI de hyaluronidase bovine préalablement à l'injection des adénovirus recombinants et 4 chez ceux ayant reçu 10 UI de l'enzyme.

L'expérience est répétée dans des souris femelles C57 BL/10 âgées de 7 semaines en mettant en oeuvre des doses supérieures de hyaluronidase. On constitue 5 groupes de 3 animaux traités par des doses variables de hyaluronidase bovine pour un volume fixe d'injection de 25 ml puis 3 heures après par 10^9 unités infectieuses d'adénovirus AdTG8509 (25 ml) . Les cinq groupes d'animaux reçoivent respectivement 0, 1, 10, 25 et 50 UI de hyaluronidase diluée dans NaCl 0,9 %. Comme précédemment, enzyme et virus sont injectés consécutivement dans les deux muscles *tibialis anterior* des souris. Toutes les souris C57 BL/10 traitées par la hyaluronidase expriment des niveaux supérieurs de luciférase par rapport au groupe témoin (0 UI). Un facteur d'amplification d'environ 10 est obtenu pour le produit associant les adénovirus recombinants et 10 UI de hyaluronidase.

Exemple 2 : Effet de la hyaluronidase sur l'administration intrachéale d'un adénovirus codant pour le gène luciférase

Les souris C57 BL/10 sont injectées par voie intratrachéale avec différentes doses de hyaluronidase (0, 0.1, 1, 10 et 50 UI dans 25 μ l de tampon PBS par injection) trois heures avant l'administration par voie intratrachéale de 10^8 UI de AdTG8509, distribuées dans 25 μ l de tampon PBS par injection.

L'activité luciférase est déterminée conformément aux dispositions de l'exemple 1, dans la trachée et dans les poumons, deux jours après l'administration du vecteur adénoviral.

Les résultats sont présentés sur la figure 1. Ceux-ci indiquent que l'activité luciférase est clairement augmentée en présence du hyaluronidase, tant dans les poumons qu'au niveau de la trachée. Un effet lié à la dose de hyaluronidase est clairement observé dans le cas de
5 l'expression au niveau de la trachée.

Les résultats observés semblent indiquer que l'expression du gène luciférase est plus faible dans les poumons que dans la trachée. Ce résultat inhabituel pourrait s'expliquer par une réaction de bronchoconstriction ou d'obstruction au niveau des poumons liées à la
10 première administration de hyaluronidase dans un animal de petite taille.

Ces résultats indiquent toutefois que le prétraitement par la hyaluronidase permet d'améliorer l'efficacité de l'expression des gènes portés par l'adénovirus administré de manière subséquente, au niveau des voies respiratoires. L'utilisation du mode d'administration par
15 aérosolisation devrait permettre de limiter l'effet négatif des administrations répétées par voie intratrachéale chez la souris en raison du volume plus réduit des compositions administrées.

REVENDICATIONS

1. Produit de combinaison comprenant au moins une substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire d'une cellule et au
5 moins un acide nucléique d'intérêt, pour une administration simultanée, consécutive ou étalée dans le temps, ledit acide nucléique étant véhiculé par une particule virale infectieuse ou sous la forme d'un vecteur synthétique.
- 10 2. Produit de combinaison selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire d'une cellule est une substance capable d'hydrolyser l'acide hyaluronique de ladite matrice.
- 15 3. Produit de combinaison selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite substance capable d'hydrolyser l'acide hyaluronique dérive d'une hyaluronidase.
- 20 4. Produit de combinaison selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite hyaluronidase dérive d'une hyaluronate glycanohydrolase de mammifère, de reptile ou d'hyménoptère, d'une hyaluronate glycanohydrolase de glande salivaire de sangsue ou d'une hyaluronate lyase bactérienne notamment de streptocoque, pneumocoque ou clostridium et, en particulier, de la hyaluronidase de testicules bovins.
- 25 5. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt est sous forme d'ADN plasmidique ou de vecteur viral.
- 30 6. Produit de combinaison selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt est sous forme d'un vecteur adénoviral

recombinant défectif pour la réplication.

7. Produit de combinaison selon la revendication 6, caractérisé en ce que le vecteur adénoviral dérive du génome d'un adénovirus et comprend
5 au moins les ITRs et une séquence d'encapsidation et est dépourvu de tout ou partie de la région adénovirale E1.
8. Produit de combinaison selon la revendication 7, caractérisé en ce que le vecteur adénoviral est en outre dépourvu de tout ou partie de la
10 région adénovirale E3.
9. Produit de combinaison selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le vecteur adénoviral est en outre dépourvu de tout ou partie d'une ou plusieurs régions sélectionnées parmi les régions E2, E4, L1, L2, L3,
15 L4 et L5.
10. Produit de combinaison selon l'une des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que le vecteur adénoviral dérive du génome d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine,
20 porcine ou simienne ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral de différentes origines.
11. Produit de combinaison selon l'une des revendications 6 à 10, caractérisé en ce que le vecteur adénoviral dérive du génome d'un
25 adénovirus humain de type 5.
12. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt est véhiculé par un vecteur synthétique sélectionné parmi les vecteurs à lipides
30 cationiques, à polymères cationiques ou les liposomes.

13. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt code pour un ARN antisens ou un polypeptide d'intérêt thérapeutique.
- 5 14. Produit de combinaison selon la revendication 13, caractérisé en ce que le polypeptide d'intérêt thérapeutique est sélectionné parmi une cytokine, un récepteur cellulaire ou nucléaire, un ligand, un facteur de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, une hormone de croissance, une enzyme, un inhibiteur d'enzyme, un polypeptide à
10 effet anti-tumoral, un polypeptide capable d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire ou virale et, notamment le VIH, un anticorps, une toxine, une immunotoxine et un marqueur.
- 15 15. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il est formulé dans un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.
- 20 16. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité de ladite substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire comprise entre 1 et 10^4 unités internationales (IU), avantageusement entre 1 et 10^3 et de préférence entre 10 et 500 IU.
- 25 17. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce en ce que ladite substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire est administrée avant l'acide nucléique d'intérêt.
- 30 18. Utilisation d'un produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 17, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique.

19. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que ledit produit de combinaison comprend une substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire dérivant d'une hyaluronidase, notamment de la hyaluronidase de testicules bovins, et un acide nucléique d'intérêt sous forme d'un vecteur adénoviral véhiculé par une particule adénovirale infectieuse.
20. Utilisation selon la revendication 18 ou 19, caractérisée en ce que ladite substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire est administrée avant l'acide nucléique.
21. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 20, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de la myopathie de Duchenne, par administration intramusculaire ou intraveineuse d'une hyaluronidase et d'un acide nucléique d'intérêt exprimant le gène codant pour la dystrophine.
22. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 20, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de la mucoviscidose, par administration intraveineuse ou dans les voies respiratoires d'une hyaluronidase et d'un acide nucléique exprimant le gène codant pour la protéine CFTR.
23. Utilisation d'une substance entraînant une désorganisation de la matrice extracellulaire pour améliorer la diffusion, le transfert et/ou l'expression d'un acide nucléique d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte, ledit acide nucléique étant véhiculé par une particule virale infectieuse ou sous la forme d'un vecteur synthétique.

1/1

TRACHEE

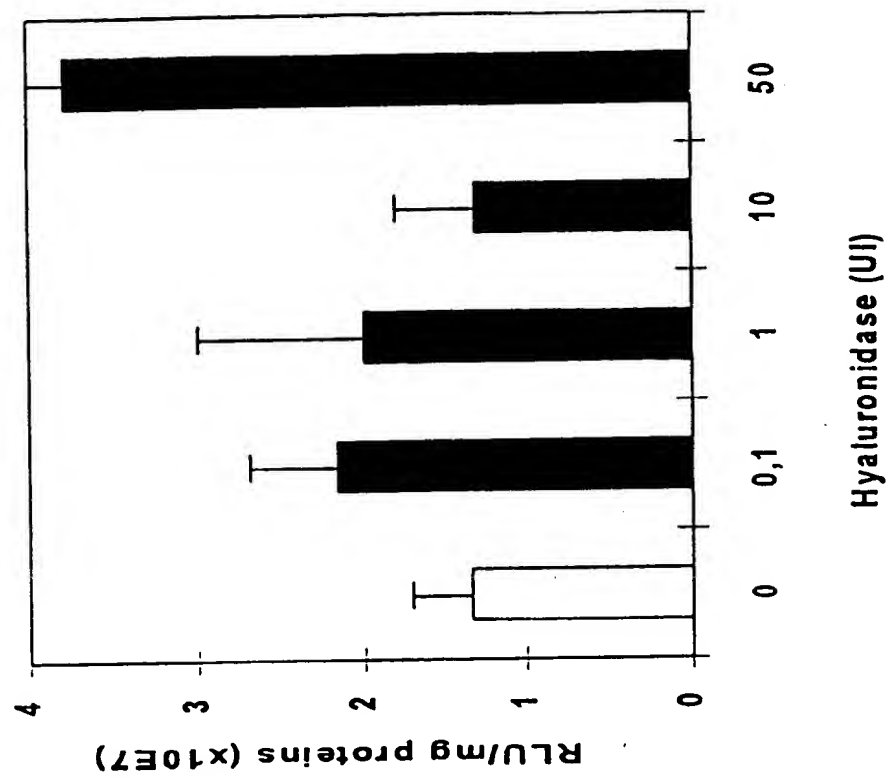


fig 2

POUMON

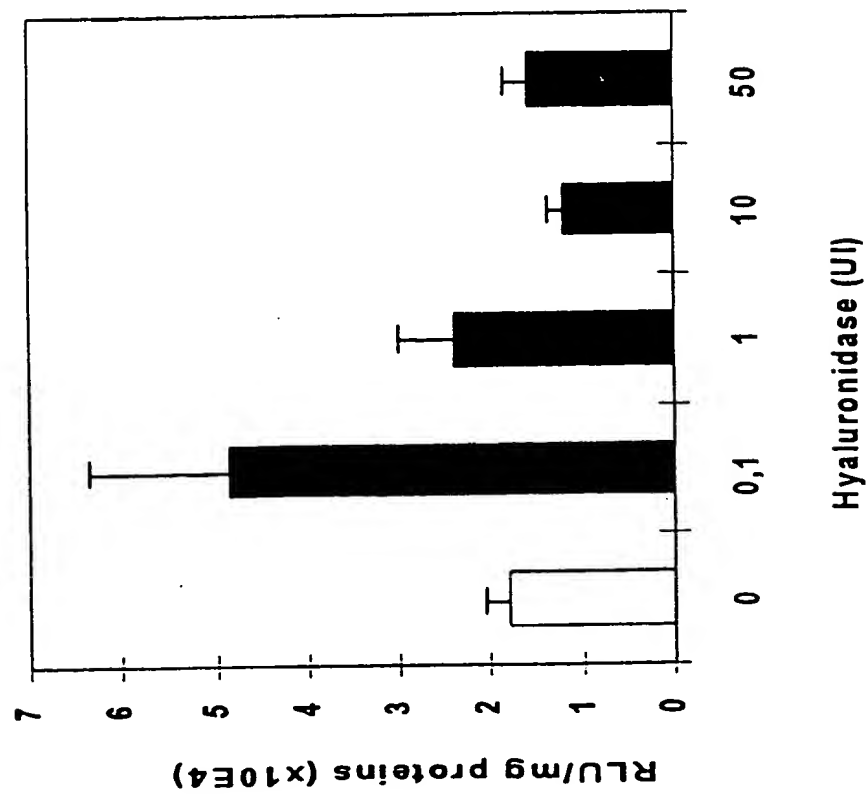


fig 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 98/01084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUBENSKY ET AL: "DIRECT TRANSFER OF VIRAL AND PLASMID DNA INTO THE LIVER OR SPLEEN OF MICE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA, vol. 81, 1984, pages 7529-7533, XP002057236 cited in the application see the whole document ---	1-23
X	WO 95 26718 A (APOLLON INC ;CARRANO RICHARD A (US)) 12 October 1995 see page 4, line 29 - page 12, line 36 see page 26, line 16 - page 27, line 9 --- -/--	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 October 1998

Date of mailing of the international search report

08/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/FR 98/01084

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 91 12329 A (UNIV TEXAS) 22 August 1991</p> <p>see page 1, line 19 - line 28</p> <p>see page 11, line 15 - line 22</p> <p>see page 24, line 19 - page 25, line 6</p> <p>-----</p>	<p>1,5-18, 20,23</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ FR 98 /01084

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 23, in part, relates to a method for treating the human / animal body, the search has been carried out based on the effects imputed to the product / to the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 98/01084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9526718 A	12-10-1995	US 5739118 A	14-04-1998
		AU 2236695 A	23-10-1995
		CA 2186913 A	12-10-1995
		EP 0772437 A	14-05-1997
		JP 9511146 T	11-11-1997
WO 9112329 A	22-08-1991	AU 7312891 A	03-09-1991
		US 5466676 A	14-11-1995

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No.
PCT/FR 98/01084

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DUBENSKY ET AL: "DIRECT TRANSFER OF VIRAL AND PLASMID DNA INTO THE LIVER OR SPLEEN OF MICE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA, vol. 81, 1984, pages 7529-7533, XP002057236 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-23
X	WO 95 26718 A (APOLLON INC ; CARRANO RICHARD A (US)) 12 octobre 1995 voir page 4, ligne 29 - page 12, ligne 36 voir page 26, ligne 16 - page 27, ligne 9 --- -/--	1-23

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

A document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 octobre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/10/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No :
PCT/FR 98/01084

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 91 12329 A (UNIV TEXAS) 22 août 1991 voir page 1, ligne 19 - ligne 28 voir page 11, ligne 15 - ligne 22 voir page 24, ligne 19 - page 25, ligne 6 -----	1,5-18, 20,23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De demande internationale n°

PCT/FR 98/01084

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°s
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Bien que la revendication 23, partiellement, concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
2. ☐ Les revendications n°s
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°s
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema Internationale No

PCT/FR 98/01084

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9526718 A	12-10-1995	US 5739118 A	14-04-1998
		AU 2236695 A	23-10-1995
		CA 2186913 A	12-10-1995
		EP 0772437 A	14-05-1997
		JP 9511146 T	11-11-1997

WO 9112329 A	22-08-1991	AU 7312891 A	03-09-1991
		US 5466676 A	14-11-1995
